

($M_w = 479,02$ г/моль), а также 2 М раствор NaCl. Последующей микроконтактной печатью плоской поверхностью со слоем ПМК запечатывали ПДМС-штамп/ПМС/Родамин В, ПДМС-штамп удаляли.

Запечатанная система из ПМК, морфологию которой изучили с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ, ESEM Quanta 400 FEG, FEI, USA), представляет множество упорядоченных микрокамер в виде цилиндров. Размеры структуры следующие: диаметр цилиндра 6 мкм, глубина 3 мкм, расстояние между центрами двух соседних 20 мкм. Толщина стенок микрокамер $1,0 \pm 0,2$ мкм. Вместимость отдельной микрокамеры составляет $\sim 2,5 \times 10^{-11}$ мл.

Успешная загрузка и сохранение Родамина В в полостях запечатанных микрокамер определяли с использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

Кристаллы NaCl кубической формы, образованные после испарения растворителя, наблюдали только внутри микролунок ПДМС-штампа/ПМК при помощи СЭМ. Так как микролуночки являются местом, в котором свободная энергия вещества минимальна.

Таким образом, была получена система из ПМК, состоящая из упорядоченных отдельных микрокамер, способная инкапсулировать водорастворимые вещества.

Список литературы

1. Byung Kook Lee, Yeonhee Yun, Kinam Park PLA Micro- and Nano-Particles // *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016. – Vol.107. – P.176–191.
2. Huayu Tian, Zhaohui Tang, Xiuli Zhuang, Xuesi Chen, Xiabin Jing Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application // *Progress in Polymer Science*, 2012. – Vol.31. – P.237–280.
3. Yusuf Haggag, Yasser Abdel-Wahab, Opeolu Ojo, Mohamed Osman, Sanaa El-Gizawy, Mohamed El-Tanani, Ahmed Faheem, Paul McCarron, Preparation and in vivo evaluation of insulin-loaded biodegradable nanoparticles prepared from diblock copolymers of PLGA and PEG // *International Journal of Pharmaceutics*, 2016. – Vol.499. – P.236–246.
4. P. Kainourgios, E.K. Efthimiadou, L.-A. Tziveleka, G.S. Pappas, N. Boukos, G. Kordas Comparative study of LbL and crosslinked pH sensitive PEGylated LbL microspheres: Synthesis, characterization and biological evaluation // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013. – Vol.104. – P.91–98.
5. Meiyu Gai, Johannes Frueh, Tianyi Tao, Arseniy V. Petrov, Vladimir V. Petrov, c Evgeniy V. Shestrikov, Sergei I. Tverdokhlebov and Gleb B. Sukhorukov Polylactic acid nano- and micro-chamber arrays for encapsulation of small hydrophilic molecules featuring drug release via high intensity focused ultrasound // *Nanoscale*, 2017. – Vol.21. – №9. – P.7063–7070.

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ПЕПТИДА pHLP В СОСТАВЕ БЕЛКА – СЛИЯНИЯ С ТИОРЕДОКСИНОМ

И.М. Кабдеш¹

Научный руководитель – к.б.н., доцент, с.н.с. А.Г. Першина^{1,2}

¹Национальный исследовательский Томский политехнический университет
634050, Россия, г. Томск, пр. Ленина 30

²Сибирский государственный медицинский университет
634050, Россия, г. Томск, Московский тракт 2 стр.18, ikabdeshe@gmail.com

Одним из активно разрабатываемых направлений в области адресной доставки противоопухолевых препаратов является создание систем, способных отвечать на внешний стимул – специфические условия среды, формирующиеся в опухоли, отклонения в концентрации веществ, присутствие определенных ферментов [1]. Дан-

ный подход направлен на решение проблем нацеливания, обусловленных гетерогенностью опухолевых клеток. Так для нацеливания используют пониженное значение межклеточной pH в опухоли, низкое содержание кислорода, наличие матричных металлопротеиназ [2] и др. pHLP (pH low insertion peptide) – векторный

пептид, чувствительный к изменению pH среды и способный закрепляться в мембране клетки. При локальном закислении межклеточной pH (ниже 7,0) — характерном свойстве многих опухолей — pHLIP меняет свою конформацию и образует специфическую структуру, альфа-спираль, которая встраивается в мембрану клетки и вводит прикрепленное к С-концу пептида pHLIP соединение в цитоплазму. В настоящее время показано успешное использование pH-зависимого пептида (pHLIP), меченного флуоресцентными маркерами [3], радионуклидными метками [4] и наночастицами [5] для выявления опухолей.

На сегодняшний день, пептид преимущественно получают методом химического синтеза. Однако, для масштабирования процесса и наработки больших количеств пептида, содержащего 36 аминокислотных остатков, выгодной альтернативой является микробный синтез с использованием технологии рекомбинантных ДНК.

Целью исследования было получить рекомбинантный pH-зависимый встраивающийся пептид pHLIP в бактериальной экспрессионной системе.

Материалы и методы. Для клонирования пептида был выбран вектор pET32a(+) (Novagen, Дармштадт) и штамм *E.coli* XL1-blue (Евроген, Москва). Процедура клонирования проводилась в соответствии со стандартными методами и протоколами. Рестрикция, дефосфорилирование, лигирование ДНК осуществлялись с использованием коммерческих наборов

в соответствии с инструкциями производителя (SibEnzyme, Новосибирск), выделение и очистка плазмиды проводились с использованием наборов «Plasmid miniprep» и «Cleanup standard» соответственно (Евроген, Москва). Экспрессия пептида была осуществлена в штамме *E.coli* Rossetta DE3 pLysS при различных условиях индукции. Слитый белок тиоредоксин (Trx) — pHLIP анализировали с использованием денатурирующего SDS-ПААГ электрофореза по Лэммли. Очистку химерного белка Trx-pHLIP проводили методом металл-хелатной аффинной хроматографии. Химическое отщепление от белка-партнера проводили с использованием BrCN с дальнейшей оценкой эффективности отщепления методом трицин-ПААГ электрофореза.

В результате была получена рекомбинантная плазида, направляющая синтез пептида pHLIP в бактериальной клетке. Соответствие клонированного фрагмента ДНК ожидаемому подтверждено секвенированием (НИИ медицинской генетики, Томск). Оптимизированы условия экспрессии пептида в составе белка-слияния с тиоредоксином (Trx-pHLIP) в клетках штамма *E.coli* Rossetta DE3 pLysS. Процент выхода слитого белка составил порядка 50% от общей массы синтезируемых белков. Осуществлена очистка слитого белка Trx-pHLIP методом металл-хелатной аффинной хроматографии. Проведено химическое отщепление пептида от белка-партнера путем обработки бромцианом с целью последующей хроматографической очистки пептида pHLIP от белковых примесей.

Список литературы

1. Karimi et al., *Smart micro/nanoparticles in stimulus-responsive drug/gene delivery systems* // *Chem Soc Rev.*, 2016.— 45(5).— P.1457.
2. Sarkar et al., *Matrix metalloproteinase-assisted triggered release of liposomal contents* // *Bioconjug Chem.*, 2008.— V.1.— P.57–64.
3. Shan L. *Cy5.5-labeled pH low insertion peptide (pHLIP)* 2009 Aug 8 [Updated 2009 Nov 12]. In: *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004–2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK23623>.
4. S. Macholl et al., *In vivo pH imaging with (99m) Tc-pHLIP* // *Mol Imaging Biol.*, 2012.— V.14.— P.725–734.
5. L. Yao et al., *pHLIP peptide targets nanogold particles to tumors* // *PNAS*, 2013.— V.11.— P.465–470.